

Penetapan Kadar Hidrokortison Asetat dalam Sediaan Krim Mengandung Pengawet Nipagin secara Spektrofotometri Derivatif Orde Pertama

Hayun¹, Nelly D. Leswara¹, Lutfhi Zarkasih¹

¹Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Depok. 16424

Email :hayun.ms06@gmail.com

Abstrak

Metode spektrofotometri yang sederhana dan cepat telah dikembangkan untuk analisis hidrokortison asetat dalam sediaan farmasi krim mengandung nipagin sebagai pengawet. Hidrokortison asetat ditentukan dengan mengukur serapan derivat pertama (rasio amplitudo) pada 257,0 nm (*zero crossing* nipagin). Kurva kalibrasi menunjukkan linier pada rentang 4,0-40,0 ppm hidrokortison asetat ($r = 0,9999$). Limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ) diperoleh masing-masing 0,9617 ppm dan 3,2050 ppm. Metode ini mempunyai presisi yang baik (keterulangan dan presisi intermediet) ($RSD \leq 2,0\%$), sedangkan rerata data hasil uji perolehan kembali (*accuracy*) adalah $102,03 \pm 0,14\%$ dan $100,23 \pm 0,69\%$, masing-masing untuk hidrokortison asetat krim 1% dan 2,5%. Metode ini berhasil diterapkan untuk penetapan kadar hidrokortison asetat tiga dari empat sampel sediaan merk dagang dan hasilnya adalah $102,93 \pm 0,22\%$, $108,48 \pm 0,19\%$ dan $106,67 \pm 0,35\%$, masing-masing untuk sampel A, B dan D. Hasil analisis sampel C menunjukkan kadar hidrokortison asetat lebih dari 110,0% dari yang tertulis pada labelnya, mengindikasikan adanya bahan tambahan lain selain nipagin dalam basis krimnya yang menginterferensi pengukuran hidrokortison asetat.

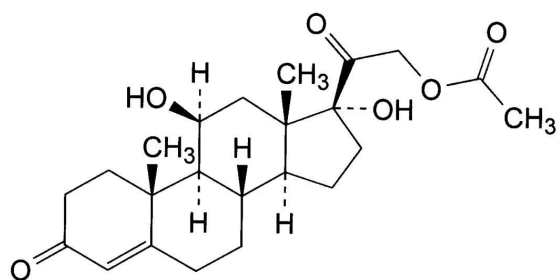
Abstract

The simple and rapid spectrophotometric methods were developed for analysis of hydrocortisone acetate in cream pharmaceutical formulations containing nipagin as preservative. Concentration of hydrocortisone acetate was determined by measuring the first derivative absorption (ratio amplitudes) at 257.0 nm (*zero crossing* for nipagin). The calibration graphs were linear over the range of 4.0-40.0 ppm of hydrocortisone acetate ($r = 0.9999$). The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were found to be 0.9617 ppm and 3.2050 ppm, respectively. This method had good precision (repeatability and intermediate precision) with $RSD \leq 2.0\%$ where as the means of the recovery data (*accuracy*) were $102.03 \pm 0.14\%$ and $100.23 \pm 0.69\%$ for hydrocortisone acetate cream 1% and 2.5%, respectively. The proposed method was applied for the determination of hydrocortisone acetate in three out of four commercial cream formulations samples and the results of label claim were $102.93 \pm 0.22\%$, $108.48 \pm 0.19\%$ and $106.67 \pm 0.35\%$ for sample A, B and D, respectively. The result of brand C analysis showed to contain more than 110.0% of the labeled amount of hydrocortisone acetate, indicated there was additive other than nipagin in the cream basis to interfere with the hydrocortisone acetate measurements.

Keywords : derivative spectrophotometry, zero crossing, hydrocortisone acetate, nipagin, cream formulations.

PENDAHULUAN

Hidrokortison asetat (Gambar 1) adalah glukokortikoida yang banyak digunakan sebagai antiinflamasi lokal akibat dermatitis (Rittel *et al.*, 2008). Obat tersebut banyak diformulasi sebagai sediaan krim (IAI, 2012). Parabens merupakan pengawet yang populer ditambahkan pada sediaan bentuk krim, pasta, produk kecantikan, perekat, lemak dan minyak, karena mempunyai aktivitas antimikroba berspektrum luas, tidak berwarna, tidak berbau, stabil dan murah. Salah satu senyawa parabens adalah metil paraben (nipagin) (Cashman, 2005). Penetapan kadar hidrokortison asetat dalam sediaan krim dilakukan melalui proses pemisahan lebih dahulu dari basis krim dan bahan tambahan termasuk pengawet yang dapat menginterferensi pengukuran hidrokorsiton asetat. Metode-metode analisis yang digunakan adalah kromatografi cair kinerja tinggi (USP 30-NF 25, 2007; BP, 2007; FI IV, 1995; Lea *et al.*, 1980; Hailey & Lea, 1981; Phoon & Stubley, 1982; Jancic-Stojantovic, 2010) dan KLT densitometri (Dolowi *et al.*, 2014; Kristiningrum dan Rakhmawati, 2012). Metode-metode tersebut membutuhkan biaya yang relatif tinggi dan waktu analisis yang relatif lama.



Gambar 1. Struktur molekul hidrokortison asetat (-BP, 2007)

Metode spektrofotometri derivatif merupakan metode yang lebih murah dan cepat dibandingkan dengan metode kromatografi. Metode ini dapat menganalisis satu atau dua/lebih senyawa secara simultan dalam campuran tanpa proses pemisahan terlebih dahulu. Spektrofotometri derivatif merupakan metode manipulatif terhadap spektra pada spektrofotometri ultraviolet dan cahaya tampak. Pada spektrofotometri konvensional, spektrum/kurva serapan merupakan plot serapan (A) terhadap panjang gelombang (λ). Pada metode spektrofotometri derivatif, plot A lawan λ , ditransformasikan menjadi plot $dA/d\lambda$ lawan λ untuk derivatif pertama, dan $d^2A/d\lambda^2$ lawan λ untuk derivatif kedua, dan seterusnya. Panjang gelombang serapan maksimum suatu senyawa pada kurva serapan normal (derivat nol) akan menjadi λ zero crossing pada kurva derivatif pertama. Panjang gelombang tersebut tidak mempunyai serapan atau $dA/d\lambda = 0$. Jika larutan mengandung dua komponen dengan λ maksimum yang berbeda, maka pengukuran pada λ zero crossing komponen satu akan menghasilkan serapan hanya dari komponen lainnya saja (Karpinska, 2012; Saakov *et al.*, 2013).

Metode spektrofotometri derivatif telah diaplikasikan secara luas untuk penentuan kadar zat aktif dalam sediaan obat, biologis dan klinik, zat warna dalam kosmetika dan makanan, analisis kimia anorganik, analisis lingkungan, dan studi kinetika (Patel *et al.*, 2010). Beberapa contoh aplikasinya untuk penetapan kadar zat aktif dalam

sediaan farmasi antara lain: penetapan kadar lakosamid dalam tablet (Chaudhari *et al.*, 2013), klindamisin sulfat dan tretinoin (Tehrani *et al.*, 2013), mometason furoat dan asam salisilat dalam sediaan semisolid (Vanani *et al.*, 2013), cemaran benzofenon dalam fenitoin (Walash *et al.*, 2011), diclofenac sodium and tiokolcikosida (Sengar *et al.*, 2010), asam salisilat dan asam benzoat dalam sediaan tinktur mengandung iodium (Hayun *et al.*, 2009), enalapril, HCT dan walsartan (Stolarczyk *et al.*, 2008), tripolidin HCl dan pseudoefedrin HCl dalam sediaan tablet (Hayun *et al.*, 2006), levodopa dan karbidopa (Madrakian *et al.*, 2004), bisfosfonat dalam tablet (Koba *et al.*, 2008), dekstrometorfan HBr dan gliserilguaiakolat dalam sediaan tablet (Fatah, 1995), dan campuran tetrasiklina dan oksitetrasiklina (Nahak *et al.*, 1992).

Tulisan ini melaporkan pengembangan metode analisis spektrofotometri derivatif untuk penetapan kadar hidrokortison asetat dalam krim yang mengandung pengawet nipagin.

METODE

Alat-alat yang digunakan adalah: spektrofotometer (Jasco V-530), timbangan analitik, alat-alat gelas untuk analisis, penangas air dan ultrasonik (Ney). Bahan-bahan yang digunakan adalah: baku pembanding hidrokortison asetat, nipagin (E Merck), etanol (Mallincrodt), aquades, basis krim mengandung nipagin, dan sampel hidrokortison asetat krim 1% dan 2,5%.

Optimasi kondisi analisis

Pemilihan pelarut. Dibuat larutan hidrokortison asetat 1000 ppm dalam etanol dengan cara seksama, dan diencerkan secara kuantitatif dengan aquades sehingga diperoleh larutan 15 ppm. Kemudian dibuat spektrum serapan normal (derivat nol) dan spektrum derivat pertama. Percobaan diulangi menggunakan pelarut pengencer etanol dan campuran etanol-aquades (1:1). Pembuatan spektrum serapan ketiga larutan diulangi lagi sebanyak lima kali dengan interval waktu 15 menit. Dipilih pelarut pengencer yang menghasilkan serapan maksimum dan minimum terbesar, dan menghasilkan serapan maksimum yang stabil selama 75 menit (koefisien variasi < 2,0%).

Penentuan zero crossing nipagin dan penentuan panjang gelombang (λ) analisis hidrokortison asetat. Dibuat secara seksama larutan nipagin 2, 4, 6, 8, 10, dan 12 ppm dalam pelarut terpilih. Daril larutan-larutan tersebut dibuat spectrum serapan derivat pertama dan ditumpang-tindihkan. Zero crossing nipagin ditunjukkan oleh λ yang memiliki serapan nol pada berbagai konsentrasi. Kemudian dibuat secara seksama larutan hidrokortison asetat 8 ppm, nipagin 4 ppm dan campuran keduanya dengan konsentrasi masing-masing 8 dan 4 ppm dalam pelarut terpilih. Ketiga larutan tersebut masing-masing dibuat spektrum serapan derivat pertama dan dicatat serapan (rasio amplitudo) dari larutan hidrokortison asetat dan larutan campuran keduanya pada λ zero crossing nipagin. λ zero crossing nipagin

yang memberikan serapan (rasio amplitudo) hidrokortison asetat terbesar dan sama antara larutan hidrokortison asetat dan campurannya merupakan λ analisis hidrokortison asetat.

Validasi metode

Metode ini divalidasi mengikuti petunjuk ICH Q2 (ICH, 2005), meliputi linieritas, akurasi, presisi, limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ).

Linearitas (kurva kalibrasi). Dibuat secara seksama larutan hidrokortison asetat 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30 dan 40 ppm; diukur serapannya pada λ analisis. Kemudian dilakukan analisis hubungan antara konsentrasi hidrokortison asetat dengan serapan (rasio amplitudo)-nya, sehingga didapat persamaan regresi linear $y = a + bx$.

Limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ). LOD dan LOQ ditentukan berdasarkan pendekatan simpangan baku dari respon dan *slope* (kemiringan) kurva kalibrasi. LOD dan LOQ dihitung berturut-turut menggunakan persamaan: $3.3 \sigma/S$ dan $10 \sigma/S$. σ adalah simpangan baku dari y-intersep garis regresi. S adalah *slope* kurva kalibrasi.

Akurasi. Akurasi ditentukan dengan melakukan uji perolehan kembali (*recovery*) sampel simulasi krim hidrokortison asetat kadar 80, 100, dan 120% dari hidrokortison asetat krim 1% dan 2,5%. Masing-masing sampel simulasi ditimbang dan dilarutkan dengan seksama dalam pelarut terpilih

hingga masing-masing diperoleh konsentrasi akhir lebih kurang 8,0; 10,0 dan 12,0 ppm, serta 10,0; 12,5 dan 15,0 ppm. Setiap sampel simulasi dianalisis triplo menggunakan larutan basis krim mengandung nipagin sebagai blangko.

Presisi. Presisi dilakukan dengan studi keterulangan (*repeatability*) dan presisi antar hari (*intermediate precision*). Keterulangan ditentukan dengan menganalisis sampel simulasi tiga kadar berbeda (80, 100 dan 100%) untuk hidrokortison asetat krim 1% dan 2,5%, masing-masing dilakukan triplo. Presisi antara hari dilakukan dengan mengulang studi keterulangan pada hari yang berbeda.

Penetapan kadar hidrokortison asetat dalam sediaan krim merk dagang

Dibuat dengan seksama larutan sampel hidrokortison asetat krim 1% dan 2,5% (masing-masing A dan B, serta C dan D) dengan pelarut terpilih hingga diperoleh konsentrasi akhir teoritik (mengacu pada label) masing-masing 10 dan 12,5 ppm. Kemudian diukur serapan (rasio amplitudo)-nya pada λ analisis hidrokortison asetat dengan larutan basis krim mengandung nipagin sebagai blangko. Percobaan dilakukan triplo untuk setiap sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kondisi analisis optimum

Data hasil percobaan untuk pemilihan pelarut menunjukkan bahwa pelarut pengencer

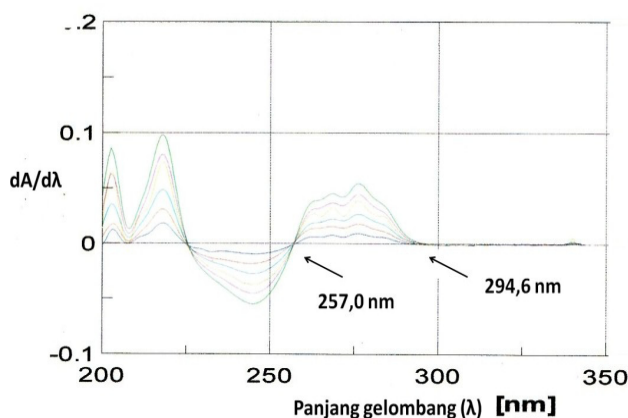
aquades menghasilkan serapan pada λ maksimum spektrum serapan derivat nol (spektrum serapan normal) dan spektrum derivat pertama hidrokortisonasetat yang tidak stabil (dalam waktu 75 menit, KV > 2,0%), sedangkan pelarut pengencer etanol atau campuran etanol-aquades (1:1) menghasilkan serapan pada λ spektrum serapan derivat

nol dan pertama yang stabil (Tabel 1). Berdasarkan hasil percobaan ini maka etanol dan campuran etanol dan aquades (1:1) dapat digunakan sebagai pelarut pengencer. Namun kemudian dipilih campuran etanol dan aquades (1:1) karena pelarut campuran ini lebih murah dibanding etanol. Kurva serapan derivat 0 hidrokortisonasetat dan

Tabel 1. Data serapan larutan hidrokortisonasetat 15,06 ppm dalam aquades, etanol dan campuran aquades dan etanol (1:1)

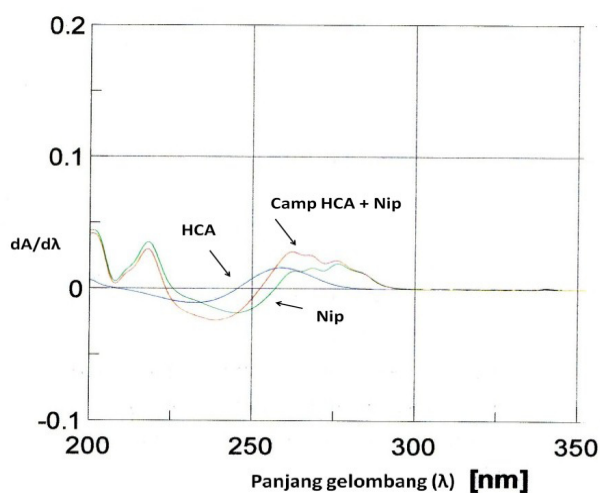
Derivat 0				Derivat 1			
λ maks (nm)	A	SD(10^{-3})	KV (%)	λ maks/min (nm)	dA/d λ	SD(10^{-3})	KV (%)
Dalam pelarut aquades							
247,8	0,5630	0,0313	5,56	262,0	0,0271	0,0016	5,86
				235,0	-0,0188	0,0013	6,76
Dalam pelarut etanol							
241,8	0,6111	0,0018	0,30	255,8	0,0313	0,0001	0,31
				229,6	-0,0167	0,0001	0,31
Dalam pelarut campuran aquades dan etanol (1:1)							
245	0,6084	0,0035	0,58	258,8	0,0305	0,0001	0,34
				231,8	-0,0218	0,0004	1,91

nipagin menunjukkan adanya *overlapping*. Oleh karena itu, pengukuran hidrokortisonasetat dalam larutan mengandung nipagin tidak dapat dilakukan secara langsung. Pada penelitian ini pengukuran hidrokortisonasetat dilakukan pada spektrum serapan derivat pertama pada λ zero crossing nipagin. Spektrum serapan derivat pertama nipagin dengan berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Gambar 2. Nipagin pada λ 257,0 dan 294,6 nm nilai dA/d λ -nya = 0 (zero crossing). Dengan demikian serapan derivat pertama larutan campuran nipagin dan hidrokortisonasetat pada λ zero crossing nipagin adalah serapan hidrokortisonasetat (Karpinska, 2012; Saakov *et al.*, 2013).



Gambar 2. Spektrum serapan derivat pertama nipagin dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 dan 12 ppm dalam pelarut campuran etanol-aquades (1:1). λ zero crossing pada 257,0 dan 294,6 nm.

Hasil pengukuran serapan derivat pertama hidrokortison pada λ zero crossing nipagin menunjukkan bahwa pada λ 257,0 memberikan serapan yang lebih besar dan konsisten pada larutan tunggal dan campurannya dibandingkan pada λ 294,6 nm (Tabel 2, Gambar 3), sehingga untuk memperoleh hasil analisis yang lebih akurat dan presisi, maka λ 257,0 nm kurva serapan derivate pertama dipilih sebagai λ analisis hidrokortison asetat.



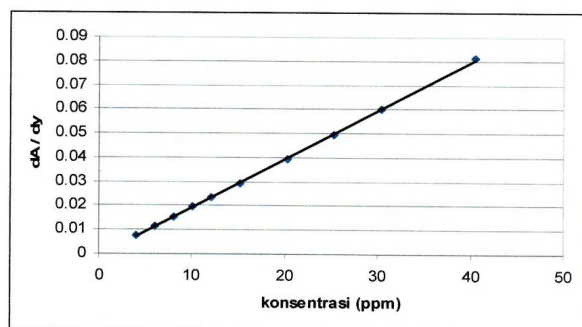
Gambar 3. Spektrum serapan derivat pertama hidrokortison asetat 8 ppm (HCA) dan nipagin 4 ppm (Nip), dan larutan campuran kedua zat itu (Camp HCA + Nip) dalam pelarut campuran etanol-aquades (1:1).

Validasi metode analisis

Serapan larutan hidrokortison asetat dalam pelarut campuran etanol-aquades (1:1) dengan konsentrasi 4-40 ppm pada panjang gelombang 257,0 nm kurva serapan derivat pertama menunjukkan hubungan yang linier dengan persamaan regresi linear $y = (-9,62131 \times 10^{-4}) + (2,01419 \times 10^{-3}) X$; nilai koefisien korelasi 0,9999. Besarnya nilai koefisien korelasi ($> 0,998$) dan nilai intersep yang hampir nol menunjukkan linieritas yang baik dari kurva kalibrasi yang diperoleh (ICH, 2005). Batas deteksi (LOD) dan kuantitasi (LOQ) dapat ditentukan melalui tiga pendekatan, antara lain evaluasi visual, rasio sinyal pada *noise*, dan penggunaan simpangan baku dari respon dan *slope* (kemiringan) kurva kalibrasi (ICH, 2005). Pada studi ini, digunakan pendekatan ketiga, diperoleh LOD 0,9617 ppm dan LOQ 3,2050 ppm. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4 dan Tabel 3. Hasil uji perolehan kembali hidrokortison asetat krim 1% dan 2,5% diperoleh berturut-turut $102,03 \pm 0,14\%$ dan $100,23 \pm 0,69\%$ (Tabel 4). Keterulangan hasil analisis berturutan pada hari yang sama (*repeatability*) dan

Tabel 2. Penentuan λ zero crossing nipagin dan λ analisis hidrokortison asetat dengan adanya nipagin

Zat	Konsentrasi (ppm)	Rasio amplitudo (dA/dλ) kurva derivat 1 (nm)	
		257,0	294,6
Nipagin	4,05	0,0000	0,0000
Hidrokortison Asetat	8,10	0,0155	0,0007
Campuran keduanya		0,0155	0,0005



Gambar 4. Kurva kalibrasi hidrokortison asetat pada λ 257,0 nm spektrum serapan derivat pertama.

keterulangan hasil analisis antar hari (*intermediate precision*) menunjukkan nilai simpangan baku relatif (RSD) tidak lebih dari 2,0% (Tabel 5). Hasil uji di atas menunjukkan bahwa pada rentang konsentrasi 80,0–120,0 % dari kadar yang umum digunakan pada sediaan krim hidrokortison asetat, metode ini memiliki akurasi dan presisi yang baik (ICH, 2005). Hasil analisis kadar hidrokortison asetat dalam krim merk dagang A, B, C dan D berturut-turut sebagai berikut: $102,93 \pm 0,22\%$,

$108,48 \pm 0,19\%$, $115,63 \pm 0,31\%$ dan $106,67 \pm 0,35\%$ (Tabel 6). Tiga sediaan merk dagang memenuhi persyaratan kadar hidrokortison asetat menurut Farmakope Indonesia atau USP, yaitu tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari yang tertulis pada label (FI IV, 1995; IUSP 30-NF 25, 2007). Spektrum serapan derivat pertama dari basis krim sampel simulasi (mengandung nipagin) pada λ 257,0 nm nilai $dA/d\lambda = 0$ (Gambar 5), hal ini menunjukkan bahwa kurva basis krim mengandung nipagin tidak menginterferensi serapan hidrokortison asetat. Dengan demikian kadar hidrokortison yang diperoleh dapat dipercaya. Kadar hidrokortison asetat satu sediaan merk dagang (sampel C) menunjukkan lebih dari 110,0%. Hal ini kemungkinan adanya bahan tambahan lain yang menginterferensi/menambah besarnya serapan hidrokortison asetat dalam sampel merk dagang tersebut.

Tabel 3. Hasil pengukuran serapan hidrokortison asetat pada 257,0 nm (derivat pertama) untuk pembuatan kurva kalibrasi, perhitungan LOD dan LOQ

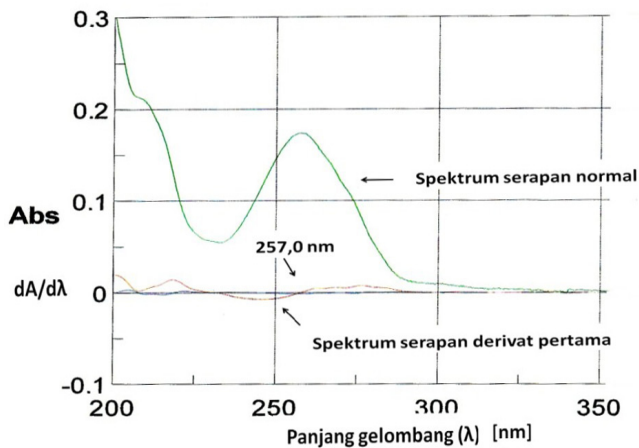
Konsentrasi (ppm)	Y_i	Y	$(Y_i - Y)^2$
4,048	0,0077	0,0072	$258,764 \times 10^{-9}$
6,072	0,0116	0,0113	$110,202 \times 10^{-9}$
8,096	0,0153	0,0153	$2,003 \times 10^{-9}$
10,120	0,0195	0,0194	$6,166 \times 10^{-9}$
12,140	0,0234	0,0235	$9,642 \times 10^{-9}$
15,180	0,0296	0,0296	$0,171 \times 10^{-9}$
20,240	0,0393	0,0398	$255,197 \times 10^{-9}$
25,300	0,0495	0,0510	$2128,680 \times 10^{-9}$
30,360	0,0602	0,0602	$0,128 \times 10^{-9}$
40,480	0,0812	0,0806	$3943,013 \times 10^{-9}$
			$\Sigma = 3,3351 \times 10^{-6}$

$$r = 0,9999$$

$$\text{Persamaan regresi: } Y = (-9,62131 \times 10^{-4}) + (2,01419 \times 10^{-3}) X$$

$$\text{LOD} = 0,9617 \text{ ppm}$$

$$\text{LOQ} = 3,2050 \text{ ppm}$$



Gambar 5. Kurva serapan basis krim mengandung nipagin (digunakan sebagai blangko)

KESIMPULAN

Metode spektrofotometri derivatif telah diteliti untuk penetapan kadar hidrokortison asetat dalam sediaan krim mengandung nipagin. Metode mempunyai akurasi dan presisi yang baik, pelaksanaannya sederhana dan cepat (tanpa pemisahan nipagin). Metode ini dapat digunakan untuk penetapan kadar hidrokortison asetat dalam sediaan merk dagang, dengan catatan tidak mengandung bahan tambahan selain nipagin yang dapat menginterferensi pengukuran hidrokortison asetat.

Tabel 4. Hasil uji akurasi hidrokortison asetat (HCA) krim 1% dan 2,5% (basis krim mengandung pengawet nipagin)

Zat	Konsentrasi larutan sampel simulasi (ppm)			Persen perolehan kembali			Rerata (%)	SD
	I	II	III	I	II	III		
HCA	8,52	8,40	8,08	102,31	102,22	102,31	102,28	0,05
	10,30	10,20	10,40	101,66	101,90	101,90	101,82	0,14
	12,31	12,25	12,41	101,85	101,85	102,25	101,98	0,23
	Rerata persen perolehan kembali						102,03	0,14
2,5%	10,21	10,03	10,12	102,34	102,34	101,85	102,18	0,28
	12,89	12,78	12,60	99,10	101,15	101,15	100,47	1,18
	15,35	15,20	15,40	98,72	97,87	97,55	98,05	0,60
	Rerata persen perolehan kembali						100,23	0,69

Tabel 5. Hasil uji presisi hidrokortison asetat (HCA) krim 1% dan 2,5% (basis krim mengandung pengawet nipagin)

Kadar label	Sampel simulasi % dari label	Standar Deviasi Relatif (RSD) (%) (n=3) ¹⁾	Standar Deviasi Relatif (RSD) (%) (n=3) ²⁾
1%	80	0,051	0,081
	100	0,136	0,126
	120	0,199	0,233
	Rerata RSD	0,144	0,147
2,5%	80	0,244	0,286
	100	0,392	0,323
	120	0,256	0,234
	Rerata RSD	0,297	0,281

Keterangan:

1) keterulangan (repeatability);

2) presisi antar hari (intermediate precision)

Tabel 6. Hasil penetapan kadar hidrokortison asetat (HCA) krim 2,5% dan 1% merk dagang

Kadar label	Kode sampel merek dagang	Kadar diperoleh \pm SD (%) (n=3)
2,5%	A	102,93 \pm 0,22
	B	108,48 \pm 0,19
1 %	C	115,63 \pm 0,31
	D	106,67 \pm 0,35

DAFTAR ACUAN

British Pharmacopoeia (BP). (2007). British Pharmacopoeia Commission, p. 527

Cashman, A.Land., & Warshaw, E.M.(2005).

Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. *Dermatitis*, 16(2), 57-66.

Chaudhari, R.D., Choksi, V.H., Divan, T., Patel, B.A., & Parmar, S.J. (2013). Development And Validation Of First Order Derivative Spectrophotometric Method For Estimation Of Lacosamide In Bulk And Tablet Dosage Form. *Asian Journal Pharmaceutical Clinical Research*, Vol 6, Suppl 3, 2013, 162-164

Fatah, A.M. (1995). Pemanfaatan Spektrofotometri Derivatif untuk Penetapan Kadar Dekstrometorfan Hidrobromida dalam Tablet Obat Batuk. *Majalah Farmasi Indonesia* 6(2). Yogyakarta : Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada, p. 41-61.

Hailey, D.M., & Lea, A.R. (1981). High performance liquid chromatographic analysis of hydrocortisone acetate ointments: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 64(4), 870-4.

Hayun., & Trinawaty, N. (2009). Penetapan kadar asam benzoat dan asam salisilat dalam sediaan tingtur/larutan topikal mengandung iodum/povidon

iodum secaraspektrofotometri derivatif. *Prosiding Kongres ISFI XVII*. Jakarta, 7-9 Desember 2009.

Hayun, Harianto & Yenti. (2006). Penetapan kadar tripolidin hidroklorida dan pseudoefedrin hidroklorida secara spektrofotometri derivatif. *Majalah Ilmu Kefarmasian (MIK)*, 3 (1): 94-105.

Ikatan Apoteker Indonesia, (2012). *Informasi Spesialis Obat Indonesia*. Vol. 47, PT ISFI Penerbitan, Jakarta.

ICH Harmonized Tripartite Guidelines (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1)*, Geneva, Nov 2005.

Jancic-Stojanović, B., Malenović, A., Marković, S., Ivanović, D., & Medenica, M. (2010). Optimization and validation of an RP-HPLC method for analysis of hydrocortisone acetate and lidocaine in suppositories. *Journal of AOAC International*, 93(1), 102-7.

Karpinska, J. (2012). *Basic Principles and Analytical Application of Derivative Spectrophotometry, Macro to Nano Spectroscopy*, Dr. Jamal Udin (Ed), In Tech Publisher, Croatia, p. 253-268.

Koba, M., Koba, K. and Przyborowski, L.(2008). Application of UV-Derivative Spectrophotometry for Determination of Some Bisphosphonates Drugs in Pharmaceutical Formulations. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 65(3), 289-294.

Lea, A.R, Kennedy, J.M., & Low, G.K., (1980). Analysis of hydrocortisone acetate ointments and creams by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 198(1), 41-7.

- Madrakian, T., Afkhami, A., Borazjani, M. and Bahram, M. (2004). Simultaneous Derivative Spectrophotometric Determination of Levodopa and Carbidopa in Pharmaceutical Preparations. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 25(12), 1764-1768.
- Nahak, Y., Riyanto, S. & Gandjar, I. G. G. (1992). Analisis Kuantitatif Campuran Tetrasiklina Hidroklorida dan Oksitetrasiklina Hidroklorida secara Spektrofotometri Derivatif. *Proceedings Pekan Analisis Obat dan Makanan I*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada, p. 391-402.
- Patel, K. N., Patel, J. K., Rajput, G. C., Rajgor, N. B. (2010). Derivative spectrometry method for chemical analysis: A review, *Der Pharmacia Lettre*, 2(2), 139-150
- Phoon, K. W. and Stubbley, C. (1982). Rapid method for the simultaneous analysis of hydrocortisone and clioquinol in topical preparations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 246(2), 297-303.
- Ritter, J. M., Lewis, L. D., Mant, T. G., and Ferro, L. (2008). *A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics* (5th ed). Hodder Arnold, 338 Euston Road, London, p. 413-414.
- Saakov, V. S., Drapkin, V. Z., Krivchenko, A. I., Rozengart, E. V., Bogachev, Y. V., Knyazev, M. N. (2013). *Derivative Spectrophotometry and Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy for Ecological and Biological Questions*. Springer-Verlag, Wien, p. 5-70.
- Sengar, M. R., Gandhi, S. V., Patil, U. P. and Rajmane, V. S. (2010). Simultaneous determination of Diclofenac Sodium and Thiocolchicoside in fixed dose combination by spectrophotometry. *Asian Journal Pharmaceutical Clinical Research*, 3 (2), 89-91.
- Stolarczyk, M., Maalanka, A., Krzek, J. and Milczarek, J. (2008). Application Of Derivative Spectrophotometry for Determination of Enalapril, Hydrochlorothiazide and Walsartan in Complex Pharmaceutical Preparations. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 65 (3), 275-281.
- Tehrani, M. B., Namadchian, M., Vatan, S. F., and Souri, E. (2013). Derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of clindamycin phosphate and tretinoin in pharmaceutical dosage forms. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21:29, p. 2-7.
- United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 30-NF25). (2007). *The United States Pharmacopeial Convention, Inc.*, Rockville, p. 2296.
- Vanani, D. R., Desai, S. D., Patel, K. G., and Shah, P. A. (2013). Application of Ratio Derivative Spectrophotometry for Simultaneous Determination of Mometasone furoate and Salicylic acid in Semisolid dosage form; *International Journal Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 3(3), 67-71.
- Walash, M. I., Rizk, M. S., Sheribah, Z. A., and Salim, M. M. (2011). Derivative spectrophotometric analysis of benzophenone (as an impurity) in phenytoin. *Chemistry Central Journal*, 5, 85